

# ニジマスA型精原細胞の持つ幹細胞能に関する基礎的・応用的研究

著者	佐藤 茉菜
学位名	博士(海洋科学)
学位授与機関	東京海洋大学
学位授与年度	2013
学位授与番号	12614博甲第316号
URL	<a href="http://id.nii.ac.jp/1342/00000985/">http://id.nii.ac.jp/1342/00000985/</a>

## 博士學位論文内容要旨 Abstract

専攻 Major	応用生命科学専攻	氏名 Name	佐藤 茉菜
論文題目 Title	ニジマス A 型精原細胞の持つ幹細胞能に関する基礎的・応用的研究		

魚類は1度の繁殖に数百億もの精子を、生涯にわたり繰り返し産生する。このような大量の精子産生を継続できるのは、精巣内に自己複製能と分化能を備えた細胞「精原幹細胞」が存在するためであると考えられている。近年、本研究室では、ニジマス *Oncorhynchus mykiss* を用いた精原細胞移植系を確立し、魚類の A 型精原細胞中 (ASG) に精原幹細胞が存在することを初めて機能的に証明した。さらに、本移植系を用いることで、精巣細胞中に存在する精原幹細胞の頻度を定量的に解析することが可能となった。そこで、本研究では、精原幹細胞の同定とその性質の理解を目指し、ニジマスを材料に、幹細胞活性の異なる集団を同定し (第1章)、その集団を用いた網羅的遺伝子発現解析により幹細胞活性の高い集団で特異的に強発現する遺伝子の同定を行った (第2章)。続いて、第3章では、これら精原幹細胞の特徴を利用した、水産業への応用を目指し、精原幹細胞の移植による遺伝的に多様な種苗の生産技術の開発を行った。

第1章では、幹細胞活性の高い集団を探索するため、初回成熟以降のニジマス精巣内に存在する ASG の幹細胞活性について、移植を用いて解析した。実験魚には、ASG が緑色蛍光を発する *vasa-GFP* 遺伝子導入ニジマスの雄個体を用い、排精を確認した日から 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11 ヶ月目、および翌年の排精確認後 1 ヶ月目にあたる排精 15 ヶ月目に精巣を採取した。得られた精巣の一部は組織学的解析に供し、残りの精巣は酵素処理による分散後、パーコール密度勾配遠心分離法およびフローサイトメトリーによる ASG の単離を行った。得られた細胞は一定細胞数ずつ宿主腹腔内へ移植し、宿主生殖腺への移動、生着を指標に、各季節の ASG が持つ幹細胞活性を調べた。その結果、排精 0-1 ヶ月目は、ASG の幹細胞活性は高かったが、排精 3-5 ヶ月目にその幹細胞活性は著しく低下することが明らかになった。その後、繁殖期が終了した排精 7 ヶ月目には、低下していた幹細胞活性は徐々に回復傾向を示した。排精 9-11 ヶ月目の精子形成期には、回復した幹細胞活性はその状態を維持した。この幹細胞活性の季節性は、ASG の形態的特徴では捉えられない性質であり、移植系を用いた機能的解析により初めて明らかとなった。次に、幹細胞活性の季節性を生み出す要因を探るため、ASG の細胞死頻度および増殖活性を免疫染色法により解析した。その結果、ASG 集団の幹細胞活性の低下が起きた時期 (1-3 ヶ月目) を含む 0-5 ヶ月の間、細胞死頻度・増殖活性ともに大きな変化は認められず、幹細胞活性の低下要因を明らかにすることは出来なかったが、ASG の幹細胞活性が回復した 5-9 ヶ月目にかけて、ASG の増殖活性が上昇した。このことから、ASG の幹細胞活性の回復は、ASG 集団全体の増殖に伴い、精原幹細胞数が増加したことにより起きたと考えられた。以上の結果から、ASG のもつ性質は、一年を通して一定に保たれておらず、明瞭な季節性を持って大きく変動していることが明らかとなった。また、排精 1 ヶ月目および 15 ヶ月目 (翌年の排精 1 ヶ月目) では、ASG の幹細胞活性、細胞死頻度、増殖活性が同様の傾向を示したことから、ASG の性質の季節的変化は周期性を持っていることが示唆された。

第1章の結果から、繁殖期の異なる時期に存在する ASG 集団は、細胞死頻度・増殖活性ともに同程度で、幹細胞活性だけが明瞭に異なる2つの集団に分けられることが明らかとなった。そこで、第2章では、第1章で同定された幹細胞活性の異なる2つの ASG 集団を用いて、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行い、幹細胞活性の異なる ASG 集団で、異なる発現パターンを示す遺伝子を探索した。その結果、幹細胞活性の高い ASG 集団で強く発現する2つの遺伝子を同定した。今後は、これら遺伝子の発現解析・機能解析により、ASG のもつ幹細胞活性と各遺伝子の関係を調べていく必要がある。

第3章では、精原細胞移植技術の種苗生産への応用を目指し、人工種苗の遺伝的多様性の創出を試みた。天然水界へと放流される人工種苗は、十分な遺伝的多様性を保持することが重要となる。そのためには、十分な数の天然親魚を用いて種苗を生産することが望まれるが、天然親魚の養成は容易ではないばかりか、広い飼育スペースや生産コストが必要となる。この問題を解決するために、複数の天然個体由来 ASG を混合した後に、家畜化が進んだ宿主個体へ移植すれば、1尾の宿主からドナー尾数と同等の遺伝的多様性を保持した配偶子を容易に得ることができると考えた。そこで、異なる遺伝的背景を持つ3系統のニジマス由来 ASG を混合移植し、単一の宿主生殖腺が複数系統由来配偶子を生産可能か検討した。その結果、

移植後 20 日目には、約 80%の宿主に全系統由来ドナーASG が同数ずつ生着した。移植後 100 日目には、宿主生殖腺内で、生着したドナーASG が増殖・分化している様子が認められた。さらに、初回成熟を迎えた雌雄の宿主を用いて交配実験を行った結果、1 尾の宿主は、その生殖腺内で 3 系統由来すべての配偶子を生産可能であることが明らかとなった。

以上、本研究により、精原細胞移植系を用いた機能的解析から、ニジマス ASG の幹細胞活性は、明瞭な季節性をもって大きく変化することが明らかとなった。さらに、繁殖期の ASG 集団内には、幹細胞活性のみが明瞭に異なる 2 つの ASG 集団が存在することが明らかとなった。今後は、幹細胞活性の高い ASG 集団の持つ特徴を、分子レベルで解析し、これにより得られた分子の発現解析・機能解析を通して、精原幹細胞の同定およびその性質の理解を行う。さらに、これにより得られた知見は、移植技術の効率化につながることから、移植技術が水産業へ応用された際に大きく貢献すると期待される。